

766.25

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: )  
TETSUYOSHI ISHIWATA, ET AL. ) : Examiner: Carrie Stroup  
Application No.: 09/129,603 ) : Group Art Unit: 1633  
Filed: August 5, 1998 ) :  
For: NOVEL PROTEIN ) : May 2, 2000

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

CLAIM TO PRIORITY

Sir:

Applicants hereby claim priority under the  
International Convention and all rights to which they are  
entitled under 35 U.S.C. § 119 based upon the following  
Japanese Priority Application:

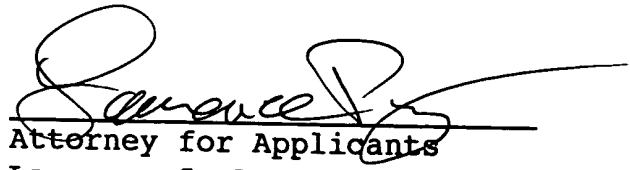
No. 8-325752 filed December 5, 1996.

A certified copy of the priority document is  
enclosed.

The Examiner is respectfully requested to  
acknowledge receipt of the claim to priority and priority  
document.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our below listed address.

Respectfully submitted,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Lawrence S. Perry", is written over a horizontal line.

Attorney for Applicants  
Lawrence S. Perry  
Registration No. 31,865

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO  
30 Rockefeller Plaza  
New York, New York 10112-3801  
Facsimile: (212) 218-2200

NY\_MAIN 79826 v 1

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 1996年12月 5日

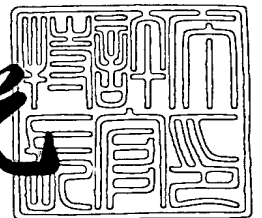
出 願 番 号  
Application Number: 平成 8年特許願第325752号

出 願 人  
Applicant (s): 協和醗酵工業株式会社  
財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

1997年11月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平09-3095321

【書類名】 特許願

【整理番号】 H08-1401Q3

【提出日】 平成 8年12月 5日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 新規蛋白質

【請求項の数】 17

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都町田市森野4-17-9

    【氏名】 石渡 哲義

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都町田市森野4-17-17

    【氏名】 大島 幹子

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都世田谷区宮坂1-18-11

    【氏名】 西村 彩子

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都町田市中町3-9-9

    【氏名】 中川 智

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都町田市中町3-9-13

    【氏名】 久我 哲郎

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都大田区東嶺町39-15

    【氏名】 西 達也

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県木更津市八幡台5-2-11

    【氏名】 野村 信夫

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市清見台南5-1-26

【氏名】 長瀬 隆弘

【発明者】

【住所又は居所】 東京都武蔵野市吉祥寺本町2-15-32

【氏名】 澤田 滋正

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県狭山市青柳124-140

【氏名】 武井 正美

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【特許出願人】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那1532-3

【氏名又は名称】 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

【代表者】 平岩 外四

【代理人】

【識別番号】 100106574

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩橋 和幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9505334

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項 2】 請求項 1 記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 3】 配列番号 1 記載の塩基配列を有する請求項 2 記載の DNA。

【請求項 4】 請求項 3 記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

【請求項 5】 請求項 2 ～ 4 記載の DNA とベクターとからなる組み換えベクター。

【請求項 6】 請求項 5 記載の組み換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 7】 請求項 6 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 1 記載の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から蛋白質を採取することを特徴とする蛋白質の製造方法。

【請求項 8】 請求項 2 ～ 4 記載の DNA の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】 請求項 2 ～ 4 記載の DNA と相補的な塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】 請求項 8 および 9 記載のオリゴヌクレオチドを用いて、請求項 1 記載の蛋白質由来の mRNA を検出する方法。。

【請求項 11】 請求項 8 および 9 記載のオリゴヌクレオチドを含む、IgA 腎症の診断薬。

【請求項 12】 請求項 8 および 9 記載のオリゴヌクレオチドを用いて、請求項 1 記載の蛋白質の発現を抑制する方法。

【請求項 13】 請求項 8 および 9 記載のオリゴヌクレオチドを含む、IgA 腎症の治療薬。

【請求項 14】 請求項 1 記載の蛋白質に特異的に反応する抗体。

【請求項 15】 請求項 14 記載の抗体を用いて請求項 1 記載の蛋白質を免疫

学的に検出する方法。

【請求項16】 請求項14記載の抗体を含む、IgA腎症診断薬。

【請求項17】 請求項14記載の抗体を含む、IgA腎症治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、健常人の白血球と比較してIgA腎症患者の白血球で発現が増加する新規蛋白質および該蛋白質に対する抗体、該蛋白質をコードするDNAおよび該DNAと相補的塩基配列を有するプライマーを用いた該蛋白質、mRNAおよびDNAの検出方法、ならびにIgA腎症の診断および治療に関する。

【0002】

【従来の技術】

IgA腎症とは、腎臓の糸球体内に血中由来と考えられるIgA免疫複合体が沈着することを特徴とする慢性糸球体腎炎である。日本では原発性腎疾患の30%以上を占め、単一の腎疾患としては最も多いものである。また、そのうちの15~30%は予後不良で腎不全へ移行する。しかしながら、IgA腎症の疾患の原因はまだ不明であるため、根本的な治療法はない。また、IgA腎症の確定診断は、腎臓の一部を生検し、メサングウムにおけるIgA免疫複合体の沈着を免疫学的染色により確認する方法であるため、患者への負担は大きい。

【0003】

ところで、IgA腎症の患者では約50%の症例で血中IgAの値が高いことが報告されている[ディージェイズ・オブ・ザ・キドニー(Diseases of the Kidney)第5版(1993)、ネフロン(Nephron)29, 170(1981)]。血液中のIgAの産生はB細胞が、その産生の制御はT細胞が担っているといわれており、また、IgA患者の末梢T細胞において、サイトカインであるインターロイキン4、インターロイキン5、インターロイキン6あるいはTGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )の産生が健常人に比べて高いという報告[クリニカル・アンド・エクスperimental・イムノロジー(Clinical & Experimental Immunology), 103, 125 (1996)、キドニー・インターナショナル(Kidney International), 46, 862 (1994)]、末



梢リンパ球において、インテグリンであるVLA (very late activation)-4 およびVLA-5 がより強く活性化しているという報告〔ネフロロジー、ダイアリシス、トランスプランテーション(Nephrology, Dialysis, Transplantation),<sup>10</sup>, 1342 (1995)] がなされている。これらのことから、IgA腎症は免疫系の異常によりIgAの産生が過剰となり、血液中のIgA免疫複合体が糸球体に沈着し、それによる補体系の活性化等が糸球体の障害に影響を及ぼしていると考えられているが、IgA腎症の原因についての報告はない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

IgA腎症の疾患原因の解明、治療あるいは患者の負担を軽減した診断が望まれている。本発明は、IgA腎症患者の白血球で発現の増加する新規蛋白質および該蛋白質に対する抗体、該蛋白質をコードするDNAおよび該DNAと相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた該蛋白質、mRNAおよびDNAの検出方法、ならびにIgA腎症の診断薬および治療薬を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、ならびに本発明の蛋白質をコードするDNA、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAまたはこれらの塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAに関する。また本発明は、該DNAとベクターとからなる組み換えベクター、組み換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体、および該形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から蛋白質を採取することを特徴とする蛋白質の製造方法に関する。

【0006】

本発明は、本発明のDNAおよび該DNAと相補的な塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチド、例えば配列番号6および7記載のオリゴヌクレオチドを用いて、本発明の蛋白質のmRNAを検出する方法、あるいは該オリゴヌクレオチドを含むIgA腎症の診断薬に関する。

本発明は、本発明のDNAおよび該DNAと相補的な塩基配列の一部を含むオ

リゴヌクレオチド、例えば配列番号6および7記載のオリゴヌクレオチドを用いて、本発明の蛋白質の発現を抑制する方法、あるいは該オリゴヌクレオチドを含むIgA腎症の治療薬に関する。

【0007】

また、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体、および該抗体を用いて本発明の蛋白質を免疫学的に検出する方法、さらには該抗体を含む、IgA腎症診断薬および治療薬に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の蛋白質としては、例えば、配列番号2記載のアミノ酸からなる蛋白質が含まれる。本発明のDNAとしては、本発明の蛋白質をコードするDNA配列または配列番号1で示される塩基配列からなるDNAもしくは該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA配列などがあげられる。

【0009】

本発明の蛋白質をコードするDNAには、一般に1つのアミノ酸に対して複数種の遺伝暗号が存在するため、配列番号1記載の塩基配列とは異なる塩基配列を有するDNAなども含まれる。

また、配列番号1記載の塩基配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA配列とは、該蛋白質の本来有する活性を失わない範囲内で、置換、欠失、挿入あるいは付加などの変異が一カ所以上導入されたDNAで、配列番号1記載の塩基配列を有するDNAまたはその断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブランク・ハイブリダイゼーション法〔モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning, A laboratory manual)、第2版〔サンプルック(Sambrook)、フリッチ(Fritsch)、マニアチス(Maniatis)編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年刊〕、以下、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版と略記する〕により得られるDNAを示す。

【0010】

新規蛋白質をコードするDNAの調製および発現は、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル（第2版）、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー（Current Protocols in Molecular Biology）、サプルメント1～34（Supplement 1～34）〔アウスベル(Ausubel)、ブレント(Brent)、キングストン(Kingston)、ムーア(Moore)、セイドマン(Seidman)、スミス(Smith)、スツール(Struhl)編集、グリーン・パブリッシング・アソシエイツ・アンド・ウェイリーインターサイエンス(Green Publishing Associates and Wiley-Interscience)発行、1987-1996年版、以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サプルメント1～34と略記する〕等に記載された方法によって、行なうことができる。

#### 【0011】

本発明では、新規遺伝子を取得するために、IgA腎症患者および健常人の白血球において、mRNAの発現量の差異に注目し、ディファレンシャル・ディスプレイ法〔FEBSレターズ (FEBS Letters) 351,231(1994)〕を用いている。ディファレンシャル・ディスプレイ法とは、発現様式を指標に新規遺伝子をクローニングする方法である。すなわち、細胞から抽出した全RNAあるいはmRNAに対し、各種プライマーを用いてポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) 反応を行い、健常人の白血球に比べIgA腎症患者の白血球で、その発現量が顕著に増加あるいは減少する新規な遺伝子のcDNA増幅断片を取得する方法である。同時に、ヒトの未分化ミエロイド細胞株KG-1よりcDNAライブラリーを構築し、あらかじめ各クローンのcDNAの全塩基配列を決定し、データベース化する。その中のクローンと前述したcDNA増幅断片とに塩基配列の一致がみられ、かつ新規なcDNA全長を得る。以下にその方法について述べる。

#### 【0012】

IgA腎症患者の白血球および健常人の白血球から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法〔Methods in Enzymol., 154,3(1987)〕、また全RNAからポリ(A)<sup>+</sup> RNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法〔モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル（第2版）〕などがあげられる。また、I

g A腎症患者の白血球および健常人の白血球からmRNAを調製するキットとしては、ファースト・トラック・mRNA・アイソレーション・キット (Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン社製)、クイック・プレップ・mRNA・ピュリフィケーション・キット (Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア社製) などがあげられる。

【0013】

I g A腎症患者の白血球および健常人の白血球から抽出したRNAから、アンカープライマーを用いてcDNAを合成し、続いて、該cDNAに対して5'末端を蛍光標識したアンカープライマーと任意プライマーとを用いてPCR反応を行う。アンカープライマーとは、チミジンを除く、アデニン、グアニンあるいはシトシンのオリゴヌクレオチドを、mRNAの3'末端ポリA配列に会合するオリゴdT配列の3'末端に付加したプライマーである。任意プライマーとしては、多種類のcDNAの配列に対して増幅し、かつ一度の反応で多数のcDNA増幅断片を得ることができるオリゴヌクレオチドが用いられ、オリゴヌクレオチドの長さとしては10mer程度が好ましい。

【0014】

PCR反応後、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、フルオロイメージャーで蛍光を検出することによりcDNA増幅断片の泳動パターンを比較する。I g A腎症患者の白血球でのみ増幅が見られるcDNA断片をゲルから回収し、該cDNA増幅断片をベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばSangerらのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463(1977)] 等によって分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。

【0015】

DNA断片を組み込むベクターとしては、pDIRECT [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research) 18, 6069 (1990)]、pCR-Script Amp SK(+) [ストラタジーン社製、ストラテジーズ (Strategies), 5, 6264(1992)]、pT7Blue (ノバジーン社製)、pCR II [インビトロジェン社製、バイオテクノロジー (Biotechnology), 9, 657(1991)]、pCR-TRAP (ジーンハンター社製) およびp

NoTA<sub>T7</sub> (5プライム→3プライム社製) などがあげられる。

【0016】

塩基配列の分析は、塩基配列自動分析装置、例えば373A・DNAシーケンサー (アプライド・バイオシステムズ社製) 等を用いて行うことができる。

cDNA全長は、前述したcDNA増幅断片をプローブとして、cDNAライブラリーよりハイブリダイゼーションによりスクリーニングして得ることができる。また、本発明のように、あらかじめcDNAライブラリーを構築し、各クローンの全塩基配列を決定してデータベース化し、その中より、前述のcDNA増幅断片の塩基配列を有するクローンを検索することにより、全長cDNAを有するクローンが得られることもある。以下に、cDNAライブラリーの作製法について述べる。

【0017】

cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル (第2版) やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サプルメント1～34等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング (Super Script<sup>TM</sup> Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning、ライフテクノロジー社製) やザップ-cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン (Stratagene) 社製] を用いる方法などがあげられる。

【0018】

cDNAライブラリーの作製の際、ヒトの未分化ミエロイド細胞株KG-1から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ (Strategies) 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research) 17, 949 4 (1989)]、λzap II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11 [DNA クローニング、ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning, A Practical Approach), Vol.1, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (クローンテック社製)、λExCell、pT7T3

18U (ファルマシア社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジ (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] およびpUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

#### 【0019】

ベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。たとえば XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジ (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジ (J. Mol. Biol.), 16, 18 (1966)] および JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

#### 【0020】

また、cDNA ライブラリーを作製せずに、cDNA を合成後両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と増幅断片の塩基配列に基づいたプライマーで PCR を行う 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) および 3'-RACE [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・USA (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 85, 8998 (1988)] によっても得ることができる。また配列番号 1 記載の塩基配列に基づいた PCR 法、あるいは DNA 合成機で化学合成する方法によって得ることもできる。

#### 【0021】

cDNA ライブラリーからの cDNA クローンの選択としては、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブランク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版] により選択することができる。また、プライマーを調製し、ポリ(A)<sup>+</sup> RNA あるいは mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) 法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (第2版)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジ、

サプメント1～34]によりcDNAを調製することもできる。

# 【0022】

上記方法により選択されたcDNAクローンを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript KS(+) (ストラタジーン社製)等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばSangerらのジデオキシ法[Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463(1977)]等によって分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。塩基配列の分析は、塩基配列自動分析装置、例えば373A・DNAシーケンサー(アプライド・バイオシステムズ社製)等を用いて行うことができる。

# 【0023】

上記の方法により得られた全長DNAを適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより、本発明の蛋白質を発現する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞など、目的とする遺伝子が発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)、バチルス・ズブチリス(Bacillus subtilis)、バチルス・アミロリクエファシネス(Bacillus amyloliquefaciens)、ブレビバクテリウム・フラバム(Brevibacterium flavum)、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(Brevibacterium lactofermentum)、コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)、マイクロバクテリウム・アンモニアフィラム(Microbacterium ammoniaphilum)等のエシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属等の微生物が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)、クリュイペロミセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)、トリコスポロン・プルランス(Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルピウス(Schwanniomyces alluvius)等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Spod

optera frugiperdaの卵母細胞であるSf9、Sf21 [バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル(Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)、オレリー(Oreilly)、ミラー(Miller)、ルーコウ(Luckow)著、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W.H. Freeman and Company)、ニューヨーク(New York)、1992年版(以下、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアルと記す)]、Trichoplusia niの卵細胞であり、ファーマーミンジェン(Pharmingen)社製からHigh5として市販されているTn5等が例示される。

【0024】

本発明のDNAを導入するベクターとしては、該DNAを組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。

細菌、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主細胞として用いる場合には、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましい。

【0025】

発現ベクターとしては、例えば、pKYP10 (特開昭58-110600)、pLSA1 [アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー(Agric. Bio. Chem.), 53, 277, (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306, (1985)] 等が用いられる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、trp プロモーター (Ptrp)、lac プロモーター (Plac)、T7 lac プロモーター、PLプロモーター、PRプロモーターなどの、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが用いられる。Ptrpを2つ直列させたプロモーター (Ptrp × 2)、tac プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等を用いてもよい。

【0026】

リボソーム結合配列としては、シャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列 (



以下、SD配列と略記する)と開始コドンの間を適当な距離(例えば、6~18塩基)に調節して用いることが好ましい。

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの塩基配列を宿主細胞での発現に最適なコドンとなるように、必要に応じて塩基を置換して用いることが好ましい。

【0027】

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci., US A, 69, 2110-2114 (1972)]、プロトプラスト法(特開昭63-2483942)等、いずれの方法も用いられる。

【0028】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp 13(ATCC37115)、YEp 24(ATCC37051)、YCp 50(ATCC37419)等が用いられる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよいが、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$ 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等があげられる。

【0029】

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法[Methods. Enzymol., 194, 182-187 (1990)]、スフェロプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 1929-1933 (1978)]、酢酸リチウム法[J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)]等、いずれの方法も用いられる。

【0030】

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p

AGE107 [特開平3-22979 ; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990) ] , pAS3-3 (特開平2-227075) , pAMoERC3Sc, pCDM8 [ネイチャー (Nature), 329, 840, (1987)]、p cDNA I / Amp、p cDNA I (いずれもフナコシ社製) 等が用いられる。

【0031】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

【0032】

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)] 等、いずれの方法も用いられる。

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サプリメント1-34、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得たのち、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質発現昆虫細胞を取得する。

【0033】

遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等が用いられる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) などが用いられる。

【0034】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)] 等が用いられる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産、融合タンパク質発現等が開発されており、いずれの方法も用いることができる。例えば、J. Sambrook et al. (モレキュラー・クローニング第2版) に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0035】

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、エキソあるいはエンドグリコシダーゼによる糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明の蛋白質を製造することができる。

【0036】

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0037】

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、糖蜜、デンプン、デンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、りん酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩またはその他の含窒素化合物の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチ

ープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体またはその消化物等が用いられる。

【0038】

無機物としては、りん酸第一カリウム、りん酸第二カリウム、りん酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下、15～40℃で16～96時間行う。培養期間中、pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0039】

培養中は必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trp プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

【0040】

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下、35～37℃で3～7日間行い、培養中は必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0041】

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [ファーミンジェン (Pharmingen) 社製]、Sf900I ISFM [ライフテクノロジーズ (Life Technologies) 社製]、ExCell400、ExCe

11405 [いずれもJRH バイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製] 等が用いられる。培養は、25～30℃で1～4日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0042】

本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合または細胞内に不溶体を形成した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん濁後、超音波法、フレンチプレス法などにより細胞を破碎し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、或いは透析し、タンパク質の立体構造を形成せしめることができる。

【0043】

本発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。

【0044】

また、本発明の蛋白質は配列番号2記載のアミノ酸配列に基づいた、化学合成法によっても製造することができる。

本発明のDNAの塩基配列に基づくオリゴヌクレオチドを用いて新規蛋白質のmRNAを検出する方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A laboratory manual Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]、PCR法 [PCR プロトコールズ(PCR Protocols), アカデミック・プレス(Academic Press) (1990)] などがあげられる。特に、RT(Room Temperature) - PCR法は、簡便であり、IgA腎症の診断に利用すること

ができる。具体的には、ヒトから採血し、白血球を回収し、そこから単離したRNAを、オリゴ(dT)プライマーと逆転写酵素を用いてcDNAに変換した後、検出したいmRNAに対応する一組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCR反応を行い、増幅断片を検出する方法である。

## 【0045】

オリゴヌクレオチドプライマーとしては、検出したいmRNAの一部の塩基配列において、5'末端側の塩基配列に相当するセンスプライマーおよび3'末端側の塩基配列に相当するアンチセンスプライマーがあげられる。ただし、mRNAにおいてウラシルに相当する塩基は、オリゴヌクレオチドプライマーにおいてチミジンとなる。

## 【0046】

センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとしては、両者の融解温度( $T_m$ )および塩基数が極端に変わることのないオリゴヌクレオチドを用いるのが好ましい。塩基数としては、15~40merが好ましい。

上述のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅させる塩基配列部分としては、mRNAのいかなる塩基配列領域でもよいが、塩基配列の長さが50bpから2kbpであり、反復配列あるいはGC(グアニン・シトシン)塩基に富む配列を含みぬ塩基配列領域が好ましい。

## 【0047】

また、同様にアンチセンスRNA/DNA〔化学46, 681 (1991)、バイオテクノロジー(Biotechnology) 9, 358 (1992)〕を用いて、DNAの転写もしくはmRNAの翻訳を抑制することにより蛋白質の発現を阻害させることもできる。

アンチセンスRNA/DNA技術を用いた該蛋白質の生産の抑制は、本発明の該蛋白質をコードするDNAの一部の塩基配列、好ましくは翻訳開始領域にある10~50塩基の塩基配列を基にしてオリゴヌクレオチドを設計・調製し、生体内に投与することにより行うことができる。合成オリゴヌクレオチドの塩基配列としては、本発明の該蛋白質をコードするDNAのアンチセンス鎖の塩基配列の一部と一致するもの、あるいは該蛋白質の活性発現を抑制する活性を失わない範囲内で改変したものを利用できる。オリゴヌクレオチドとしてはDNA、RNAまた

はその誘導体たとえばメチル体やフオスフォロチオエート体を用いることができる。

#### 【0048】

また、本発明の蛋白質、あるいは配列番号2記載のアミノ酸配列に基づいて化学合成した本発明の蛋白質の一部であるペプチドを抗原として免疫することにより抗体を製造することができる。すなわち免疫した動物の脾細胞とマウスのミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、このハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を採取することにより本発明の蛋白質に対するモノクローナル抗体を製造することができる。また、免疫した動物の免疫血清を採取することにより本発明の蛋白質に対するポリクローナル抗体を製造することができる。

#### 【0049】

以下、本発明の実施例を示す。

#### 【0050】

##### 【実施例】

##### 実施例1 ヒト未分化ミエロイド細胞株KG-1 cDNAライブラリーの作製

##### (1) KG-1細胞からのポリ(A)<sup>+</sup> RNAの取得

ヒト未分化ミエロイド細胞株であるKG-1 (ATCC CCL246) を、ウシ胎児血清10%を添加したイスコフ改変ダルベッコ培地 (ギブコBRL社製) で培養し、細胞をペレットとして回収した。細胞ペレット1mlに対して、細胞溶解液 [140mM NaCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、10mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris) -HCl (pH8.5)、0.5% ノニデット P-40] 2.8ml、400mM バナジル硫酸リボヌクレオチド複合体0.2mlを添加して氷上で溶解させた後、1mlのショ糖溶液 [140mM NaCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、10mM Tris-HCl (pH8.5)、1% ノニデット P-40、24% ショ糖] 上に重層し、2℃で30,000rpm、30分間遠心した。RNAを含む上清4mlに酵素反応用緩衝液 [200mM Tris-HCl (pH7.5)、25mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、300mM NaCl、2% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)] 4mlおよび、10mg/ml プロテイナーゼKを200μlを添加し、室温で5分間反応させた。この反応液に対して、フェノール抽出、クロロホルム抽出を行い、エタノー

ル沈殿を行ってRNAを回収した。RNAを緩衝液 [20mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1mM EDTA、0.1% SDS] 4.5mlによく溶解させた後、70℃で5分間加熱後急冷し、5M LiCl 0.5mlを添加した。これを2℃で8,000rpm、10分間遠心した後、上清を70℃で5分間加熱後急冷し、吸着用緩衝液 [20mM Tris-HCl (pH7.5)、500mM LiCl、0.1mM EDTA、0.1% SDS] で平衡化させたオリゴd(T)セルロースカラム [オリゴdTセルロース (シグマ社製) をパスツールピペットにつめたもの] にのせた。カラムから排出された溶液を、70℃で5分間加熱後急冷し、もう一度カラムにのせ、ポリ(A)<sup>+</sup> RNAを吸着させた。吸着用緩衝液 1mlでカラムを洗浄し、さらに吸着用緩衝液 1.5mlで3回、洗浄用緩衝液 [20mM Tris-HCl (pH7.5)で、100mM LiCl、0.1mM EDTA] 1.5mlで5回カラムを洗浄し、溶出用緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1mM EDTA] 3mlで溶出させて、ポリ(A)<sup>+</sup> RNAを回収した。細胞ペレット 6ml (2g) より、8mgの全RNAを得、そこからポリ(A)<sup>+</sup> RNA 200  $\mu$ gを得た。

【0051】

## (2) cDNAライブラリーの作製

得られたポリ(A)<sup>+</sup> RNA 40  $\mu$ g (40  $\mu$ l) に、配列番号3に示したポリd(T)-Not I プライマー 8  $\mu$ l (9.1  $\mu$ g)、5mM Tris-HCl (pH8.3) 32  $\mu$ l、蒸留水 120  $\mu$ l を添加した。DNAの合成については、ヌクレック・アシッド・リサーチ [Nucleic Acids Res., 12, 4539 (1984)] 記載の方法により行った。70℃で10分間加熱後急冷し、5×逆転写酵素反応用緩衝液 [250mM Tris-HCl (pH8.3)、375mM KCl、15mM MgCl<sub>2</sub>] 64  $\mu$ l、100mM ジチオスレイトール (DTT) 32  $\mu$ l、20mM dNTP (dATP、dGTP、dTTP、dCTP) 8  $\mu$ lを添加し、37℃で2分間加温後、逆転写酵素スーパー スクリプト・リボヌクレアーゼHマイナスリバー ストランスクリプターゼ (SUPERScript RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase) (ギブコBRL社製) 3,200 単位 (16  $\mu$ l) を添加して37℃で1時間反応させ、cDNAを合成した。この反応液に20mM dNTP 15  $\mu$ l、100mM DTT 60  $\mu$ l、15mM  $\beta$ -ニコチンアミドジヌクレオチド 16  $\mu$ l、蒸留水 929  $\mu$ lを添加し、さらに、E. coliリボヌクレアーゼH (宝酒造社製) 32単位 (16  $\mu$ l)、DNAポリメラーゼ I (宝酒造社製) 256単位 (32  $\mu$ l)、およびE. coli DNAリガーゼ (宝酒造社



製) 480単位 (8  $\mu$ l) を添加して16℃で2時間反応させ、cDNAを2本鎖にした。T4 DNAポリメラーゼ48単位 (24  $\mu$ l) を添加し、16℃で5分間反応させ、末端を平滑化し、200mM EDTA 24  $\mu$ lを添加して70℃で10分間加熱して反応を停止させた。この反応液をフェノールクロロホルム抽出後、エタノール沈殿し、さらにエタノール沈殿を2回繰り返してcDNAを精製した。この2本鎖cDNAをTE緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA (pH8.0)] 40  $\mu$ lに溶解させ、10×制限酵素反応用緩衝液 [500mM Tris-HCl(pH7.5)、100mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、1M NaCl、0.1% Triton X-100、0.1%ウシ血清アルブミン (BSA)] 60  $\mu$ l、蒸留水460  $\mu$ lを添加し、さらに制限酵素Not I (宝酒造社製) 320単位 (40  $\mu$ l) を添加して37℃で2時間切断反応後、さらにNot I 192単位 (24  $\mu$ l) を添加して37℃で1時間反応後、70℃で3分間加熱して反応を停止した。フェノールクロロホルム抽出後、エタノール沈殿し、さらにエタノール沈殿を2回繰り返してcDNAを精製した。このcDNAを5～30%のショ糖密度勾配で24,000rpmで24時間遠心して、6 kbより大きい画分、2～6 kbの画分、2 kb未満の画分にそれぞれ分けた。2～6 kb画分0.5  $\mu$ gとNot I-EcoR Vで切断したプラスミドベクターpBluescript SK+ 0.5  $\mu$ gをライゲーションし、大腸菌DH10B (ギブコ社製) に導入することによりcDNAライブラリーを作製した。

#### 【0052】

##### (3) KG-1 cDNAライブラリーの各クローンのcDNAの塩基配列の決定

ライブラリー中の各クローンのcDNAの塩基配列を、パーキンエルマー社の373DNAシーケンサーを用いて決定した。塩基配列決定のための具体的試薬および方法はパーキンエルマー社のダイプライマーサイクルシーケンシングFSレディーリアクション(Dye primer cycle sequencing FS Ready Reaction)キットを使用し、キットの指示に従った。得られた各cDNAの塩基配列を集め、データベースとした。

#### 【0053】

##### 実施例2 新規遺伝子KIAA0235のcDNA断片のクローン化

##### (1) IgA腎症患者および健常人の白血球からの全RNAの取得

IgA腎症の患者5名、健常人5名からそれぞれ20mlずつ採血し、1000単位

／m l ヘパリンナトリウム溶液（清水製薬社製）500  $\mu$  l を添加して凝固を抑制後、遠心チューブに移し、室温で3,300rpm、15分間遠心後、白血球画分として中間層のバフィーコートを用いた遠心チューブに移した。A G P C法〔実験医学9, 1937, (1991)〕またはRNA回収用キットRNAeasy（QIAGEN社製）で全RNAを取得した。

【0054】

（2）IgA腎症患者および健常人の白血球全RNAを用いた蛍光ディフュージョン・ディスプレイ

それぞれの全RNA2.5 $\mu$ gについて、全体が9 $\mu$ lになるように蒸留水を添加し、5'端をフルオレセインイソチオシアネート（以下、FITCと称す）で蛍光標識したアンカープライマーFCH（塩基配列は配列番号4：サワディー社製 50 $\mu$ M）1 $\mu$ lを加えて70℃で10分間加熱後、すぐ氷冷した。蒸留水2 $\mu$ l、5 $\times$ 逆転写酵素反応用緩衝液4 $\mu$ l、100mM DTT 2 $\mu$ l、10mM dNTP 1 $\mu$ l、逆転写酵素SUPERScript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase（ギブコBRL社製）1 $\mu$ l（200単位）を添加して混合し、25℃で10分間、42℃で50分間反応させてcDNAを合成し、90℃で5分間加熱して反応を停止させた。この反応液にTE緩衝液80 $\mu$ lを添加した。

【0055】

合成した各々のcDNA 1 $\mu$ lに、蒸留水14.7 $\mu$ l、10 $\times$ PCR用緩衝液〔100mM Tris-HCl（pH8.8）、500mM KCl、15mM MgCl<sub>2</sub>、1%トライトンX-100〕2 $\mu$ l、2.5mM dNTP 0.8 $\mu$ l、50 $\mu$ M蛍光標識アンカープライマーFCH 0.3 $\mu$ l、任意プライマーOPD-16（塩基配列は配列番号5：オペロン社製 10 $\mu$ M）1 $\mu$ l、DNAポリメラーゼGene Taq（ニッポンジーン社製、5単位／ $\mu$ l）0.2 $\mu$ lを添加し、サーマルサイクラーにセットした。94℃で3分間、40℃で5分間、72℃で5分間反応させた後、95℃で15秒間、40℃で2分間、72℃で1分間からなる工程を1サイクルとして27サイクル反応を行い、最後に72℃で5分間反応させてPCRを行った。

【0056】

各々のPCR反応液4 $\mu$ lに電気泳動サンプル用溶液（95%ホルムアミド、0.1

%キシレンシアノール、0.1%ブロムフェノールブルー) 3  $\mu$ lを添加し、95℃で2分間加熱後すぐ氷冷し、6%アクリルアミドゲル、1500V、2.5時間で電気泳動を行った。電気泳動用緩衝液としては89mM Tris、89mMホウ酸、2mM EDTAを用いた。フルオロイメージャー(モレキュラー・ダイナミックス社製)を用いて電気泳動後のゲルの蛍光を測定し、PCRで増幅した断片を検出、比較した。健常人5例に比較して、IgA腎症患者の白血球5例で共通して顕著に増加したバンドを記録した。再度、別のIgA腎症患者3例と健常人3例から全く同様に全RNAを取得し、同様にディファレンシャル・ディスプレイ法を行って、2度のディファレンシャル・ディスプレイ法でともに発現量に増加がみられた約200bpのバンドをゲルから切り出した。

【0057】

切り出したゲルの約1/4に蒸留水38  $\mu$ l、10×PCR用緩衝液5  $\mu$ l、2.5mM dNTP 4  $\mu$ l、蛍光標識していないアンカープライマーNC(塩基配列は配列番号4:サワディー社製 34  $\mu$ M) 0.6  $\mu$ l、10  $\mu$ M任意プライマーOPD-16(塩基配列は配列番号5) 2  $\mu$ l、DNAポリメラーゼGene Taq 0.5  $\mu$ lを添加し、94℃で3分間加熱後、95℃で15秒間、40℃で2分間、72℃で1分間からなる工程を1サイクルとして30サイクル反応を行い、最後に72℃で5分間反応させてPCRを行った。反応後の液をフェノールクロロホルム(1:1)抽出し、さらにクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)抽出後、エタノール沈殿をし、10  $\mu$ lのTE緩衝液に溶解させた。

【0058】

増幅断片1  $\mu$ lとPCR断片クローニング用ベクターpT7BlueT-Vector(ノバジェン社製)1  $\mu$ lを混合し、DNAライゲーションキット ver.1(宝酒造社製)を用いて、キットの指示に従い、プラスミドに増幅断片を組み込んだ。大腸菌DH5 $\alpha$ (ギブコBRL社製)を形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。該形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドDNAを単離した。このプラスミドDNA 0.3ngを蒸留水19  $\mu$ lに溶解し、10×PCR用緩衝液2.5  $\mu$ l、2.5mM dNTP 2  $\mu$ l、34  $\mu$ MアンカープライマーNC 0.3  $\mu$ l、10  $\mu$ M任意プライマーOPD-16 1  $\mu$ l、DNAポリメラーゼGene Taq 0.5  $\mu$ lを添加し、増幅断片の再増幅と同じ条件でPCRを行

ったところ約200bpの断片が増幅することから、該プラスミドに増幅断片が組み込まれたことが確認された。

【0059】

### (3) 増幅断片の塩基配列の決定

増幅断片の塩基配列をDNAシーケンサー（パーキンエルマー社製）を用いて決定した。塩基配列決定に用いた試薬および方法についてはパーキンエルマー社のダイプライマーサイクルシーケンシングFSレディーリアクション(Dye primer cycle sequencing FS Ready Reaction)キットを使用し、キットの指示に従った。得られた塩基配列は配列番号1のDNA配列1076～1261番目に相当した。得られた塩基配列を塩基配列データベースGenBankと比較したところ、該塩基配列と一致する塩基配列はデータベース中の既存の塩基配列ではなく、新規遺伝子のcDNA断片と考えられた。そこで、この塩基配列をKG-1cDNAライブラリー中のcDNA塩基配列データベースと比較したところ、遺伝子KIAA0235のcDNAの塩基配列の一部と完全に一致することより、KIAA0235がIgA腎症患者の白血球で発現が上昇する新規遺伝子であることを見いだした。KIAA0235は、配列番号1に示したように5399bpの長さを持ち、その中に850アミノ酸からなるオープンリーディングフレーム(ORF)が存在した。アミノ酸配列については配列番号2に示した。KIAA0235の塩基配列をデータベースGenbank/EMBLと比較したところ、一致する塩基配列はなく、新規な遺伝子のcDNAであることがわかった。また、このcDNAのORFがコードするアミノ酸配列をデータベースと比較したところ、ショウジョウバエの胚発生時に、母親由来のhunchback遺伝子のmRNAと結合し、腹部体節の形成に重要な役割をもつpumilio遺伝子〔デベロップメント(Development), 114, 221 (1992)、セル(Cell), 80, 747 (1995)]のアミノ酸配列と、C末端側で相同性を有していた。また、すでにこのKG-1由来のcDNAクローンの中で報告されているKIAA0099〔DNAリサーチ(DNA Research), 2, 37 (1995)]のORFのアミノ酸配列とも、82%の相同性を有していた。

### 実施例3 ヒトの細胞および各組織でのKIAA0235のノーザンブロット

続いて、ヒトの細胞および組織における新規遺伝子KIAA0235のmRNAの発現を調べるために、ノーザンブロットを行った。

## 【0060】

ヒトの各組織のmRNAをブロッティングした、クローンテック社のフィルターを用いて、ノーザンブロットによりヒト各組織中のKIAA0235のmRNAの発現を検出した。フィルターである、ヒューマン・MTN・ブロット (Human MTN Blot) には、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および脾臓のmRNAがブロッティングされている。また、ヒューマン・MTN・ブロットII (Human MTN Blot II) には、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸および末梢白血球mRNAがブロッティングされている。細胞としては、ヒト子宮頸ガン細胞株HeLa細胞から実施例1と同様にして取得したpoly(A)+RNA、KG-1のpoly(A)+RNA各々2 $\mu$ gをアガロースゲル電気泳動し、フィルターBiodyne A (ポール社製) に転写し、同様にノーザンブロットによりKIAA0235のmRNAの発現を検出した。プローブとして使用するため、実施例1で作製したcDNAライブラリー中のKIAA0235 cDNAを含むプラスミドクローンHA4677をNot I (宝酒造社製) とHind III (宝酒造社製) で切断し、KIAA0235 cDNA断片を精製した。この断片50ngを、 $[\alpha$ - $^{32}$ P] dCTPおよびBcaBESTラベリングキット (宝酒造社製) を用いて $^{32}$ P標識した。標識の具体的試薬および方法はキットの指示に従った。

## 【0061】

ハイブリダイゼーション液 [50%ホルムアミド、5 $\times$ SSC、5 $\times$ デンハルト溶液 (0.1% BSA、0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン)、0.25% SDS、100 $\mu$ g/mlの超音波処理した後変性 (電子レンジで沸騰後水中で急冷することを3回繰り返した) させたニシン精子DNA] にフィルターを浸して密封し、37 $^{\circ}$ Cで一晩プレハイブリダイゼーションをした。次にプローブを電子レンジで沸騰後水中で急冷することを3回繰り返して変性させ、ハイブリダイゼーション液に添加して、フィルターを浸して密閉し、37 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。

## 【0062】

フィルターを取り出し、0.1% SDSを含む1 $\times$ SSC中で室温で振とうして洗浄した。液を新しくして、さらに数回洗浄を繰り返し、0.5% SDSを含む0.1 $\times$ SSC中でとも洗いした後、0.5% SDSを含む0.1 $\times$ SSC中で50 $^{\circ}$ Cで1時間

振とうして洗浄した。最後に0.1% SDSを含む1×SSCでゆすいで風乾させた。フィルターをイメージングプレート（富士フィルム社製）と重ねて、4時間オートラジオグラフィーを行い、バイオイメージングアナライザーBAS2000（富士フィルム社製）で解析した。その結果を図1に示す。心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸および末梢白血球のすべての組織において、5.5kbおよび6.8kbの2種類の長さのmRNAに相当するバンドが検出された。したがってKIAA0235は各組織で普遍的に発現している遺伝子であることがわかった。また、KG-1およびHeLa細胞でも同様に5.5kbおよび6.8kbの2種類の長さのmRNAに相当するバンドが検出され、両方でKIAA0235が発現していることが確認された。

#### 実施例4 KIAA0235のRT-PCRによる発現の特異性の検出

実施例2で得られたIgA腎症患者5例および健常者5例の白血球からの全RNA 2  $\mu$ gに対して一本鎖cDNA合成キットSuperscript preamplification system（BRL社製）を用いて、キットに付属のオリゴdTプライマーにより一本鎖cDNAを合成した。具体的試薬と方法はキットに付属のプロトコールにしたがった。反応後の溶液21  $\mu$ lに蒸留水399  $\mu$ lを添加して全体を420  $\mu$ lにし、そのうちの10  $\mu$ lを用いて、RT-PCRにより各増幅断片に対応するmRNAの発現量を検出した。すなわち、白血球一本鎖cDNA 10  $\mu$ lに蒸留水15.8  $\mu$ l、10×PCR用緩衝液4  $\mu$ l、2.5mM dNTP 3.2  $\mu$ l、DMSO 2  $\mu$ l、10  $\mu$ M KIAA0235特異的5'側センスプライマー（配列番号6）2  $\mu$ l、10  $\mu$ M KIAA0235特異的3'側アンチセンスプライマー（配列番号7）2  $\mu$ l、1単位/ $\mu$ lに希釈したDNAポリメラーゼGene Taq 2  $\mu$ lを添加し、97℃ 5分間加熱し、氷中で5分間冷却した後、94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる工程を1サイクルとして28サイクルのPCR反応を行った。2%アガロースゲル電気泳動後、0.01%サイバーグリーン（宝酒造社製）で染色し、増幅した断片の量をフルオロイメジャーで定量し、mRNAの相対発現量とした。

#### 【0063】

mRNAの量を校正するために、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ（G3PDH）遺伝子について、配列番号8およ

び9に示した特異的プライマーを用いて同様の反応を行い、各遺伝子のmRNAの発現量をG3PDH mRNAの発現量に対する比で校正した後、IgA腎症患者5例の平均値と健常者5例の平均値を比較した。その結果を図2に示した。IgA腎症患者白血球では健常者に比べ6.6倍のKIAA0235を発現していることが確認された。

【0064】

【発明の効果】

本発明により得られる新規遺伝子を用いることによりIgA腎症の治療や診断が可能である。

【0065】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：5399

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

セルライン：KG-1

A GAA TTT TCA AAT CCT GAA ACT CAG AAT CTG GAT GCC ATG GAA CAA GTT 49

Glu Phe Ser Asn Pro Glu Thr Gln Asn Leu Asp Ala Met Glu Gln Val

1 5 10 15

GGT CTG GAA TCC TTA CAG TTT GAC TAT CCT GGT AAT CAG GTA CCA ATG 97

Gly Leu Glu Ser Leu Gln Phe Asp Tyr Pro Gly Asn Gln Val Pro Met

20 25 30

GAC TCT TCA GGA GCT ACT GTA GGC CTT TTT GAC TAC AAT TCC CAG CAG 145

Asp Ser Ser Gly Ala Thr Val Gly Leu Phe Asp Tyr Asn Ser Gln Gln

35 40 45

CAG CTC TTT CAG AGG ACT AAT GCA CTA ACA GTT CAA CAG TTA ACT GCA 193

Gln Leu Phe Gln Arg Thr Asn Ala Leu Thr Val Gln Gln Leu Thr Ala

50 55 60

GCT CAA CAG CAG CAA TAT GCA TTA GCA GCA GCT CAG CAG CCA CAT ATA 241

Ala Gln Gln Gln Gln Tyr Ala Leu Ala Ala Ala Gln Gln Pro His Ile

65 70 75 80

GCT GGT GTA TTC TCA GCA GGC CTT GCT CCA GCT GCA TTT GTG CCA AAT 289

Ala Gly Val Phe Ser Ala Gly Leu Ala Pro Ala Ala Phe Val Pro Asn

85 90 95



CCA TAC ATT ATT AGT GCT GCT CCT CCA GGG ACC GAT CCG TAT ACT GCA	337
Pro Tyr Ile Ile Ser Ala Ala Pro Pro Gly Thr Asp Pro Tyr Thr Ala	
100 105 110	
GCA GGA TTG GCT GCA GCA GCT ACA TTA GCA GGT CCA GCA GTG GTT CCA	385
Ala Gly Leu Ala Ala Ala Ala Thr Leu Ala Gly Pro Ala Val Val Pro	
115 120 125	
CCT CAG TAT TAC GGC GTT CCA TGG GGG GTG TAT CCA GCC AAC TTA TTT	433
Pro Gln Tyr Tyr Gly Val Pro Trp Gly Val Tyr Pro Ala Asn Leu Phe	
130 135 140	
CAG CAG CAA GCT GCA GCT GCG GCA AAT AAC ACA GCC AGT CAG CAA GCA	481
Gln Gln Gln Ala Ala Ala Ala Ala Asn Asn Thr Ala Ser Gln Gln Ala	
145 150 155 160	
GCA TCA CAA GCT CAG CCT GGA CAG CAA CAG GTT CTC CGT GCT GGA GCA	529
Ala Ser Gln Ala Gln Pro Gly Gln Gln Gln Val Leu Arg Ala Gly Ala	
165 170 175	
GGT CAG CGT CCT CTT ACT CCC AAT CAG GGT CAG CAA GGG CAG CAA GCA	577
Gly Gln Arg Pro Leu Thr Pro Asn Gln Gly Gln Gln Gly Gln Gln Ala	
180 185 190	
GAA TCA CTT GCG GCA GCT GCA GCA GCA AAT CCA ACA TTG GCT TTT GGT	625
Glu Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asn Pro Thr Leu Ala Phe Gly	
195 200 205	
CAG GGT CTT GCT ACT GGC ATG CCA GGC TAT CAA GTA CTA GCT CCA ACT	673
Gln Gly Leu Ala Thr Gly Met Pro Gly Tyr Gln Val Leu Ala Pro Thr	
210 215 220	
GCC TAT TAT GAT CAG ACT GGT GCC TTA GTG GTT GGC CCT GGA GCA AGG	721
Ala Tyr Tyr Asp Gln Thr Gly Ala Leu Val Val Gly Pro Gly Ala Arg	
225 230 235 240	
ACT GGC CTT GGA GCT CCA GTT CGG TTA ATG GCT CCA ACA CCT GTT TTA	769
Thr Gly Leu Gly Ala Pro Val Arg Leu Met Ala Pro Thr Pro Val Leu	

245	250	255	
ATT AGT TCA GCA GCA GCA CAA GCT GCA GCA GCA GCA GCA GCT GGA GGA			817
Ile Ser Ser Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly			
260	265	270	
ACT GCA AGT AGC CTT ACA GGC AGC ACA AAT GGT CTG TTT CGG CCA ATT			865
Thr Ala Ser Ser Leu Thr Gly Ser Thr Asn Gly Leu Phe Arg Pro Ile			
275	280	285	
GGC ACT CAG CCA CCA CAG CAG CAG CAA CAG CAG CCA AGC ACT AAT CTG			913
Gly Thr Gln Pro Pro Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Ser Thr Asn Leu			
290	295	300	
CAA TCT AAT TCA TTT TAT GGA AGC AGT TCT TTG ACT AAT AGC TCC CAG			961
Gln Ser Asn Ser Phe Tyr Gly Ser Ser Ser Leu Thr Asn Ser Ser Gln			
305	310	315	320
AGT AGT TCT TTA TTT TCT CAT GGA CCT GGT CAA CCT GGA AGT ACA TCT			1009
Ser Ser Ser Leu Phe Ser His Gly Pro Gly Gln Pro Gly Ser Thr Ser			
325	330	335	
CTT GGC TTT GGA AGT GGT AAC TCT TTG GGT GCT GCT ATA GGC TCA GCC			1057
Leu Gly Phe Gly Ser Gly Asn Ser Leu Gly Ala Ala Ile Gly Ser Ala			
340	345	350	
CTC AGT GGA TTT GGT TCA TCA GTT GGC AGT TCT GCA AGT AGT AGT GCC			1105
Leu Ser Gly Phe Gly Ser Ser Val Gly Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ala			
355	360	365	
ACA AGG AGA GAG TCT CTA TCT ACT AGC TCT GAC TTG TAC AAA AGA TCT			1153
Thr Arg Arg Glu Ser Leu Ser Thr Ser Ser Asp Leu Tyr Lys Arg Ser			
370	375	380	
AGT AGC AGC CTA GCA CCC ATA GGG CAA CCA TTT TAC AAT AGT CTG GGA			1201
Ser Ser Ser Leu Ala Pro Ile Gly Gln Pro Phe Tyr Asn Ser Leu Gly			
385	390	395	400
TTT TCC TCC TCT CCA AGT CCA ATA GGC ATG CCT CTG CCA AGC CAA ACT			1249

Phe Ser Ser Ser Pro Ser Pro Ile Gly Met Pro Leu Pro Ser Gln Thr	
405 410 415	
CCA GGA CAT TCA CTT ACG CCA CCG CCA TCA CTT TCA TCA CAT GGA TCC	1297
Pro Gly His Ser Leu Thr Pro Pro Pro Ser Leu Ser Ser His Gly Ser	
420 425 430	
TCA TCC AGT TTG CAT TTA GGA GGA CTG ACA AAT GGT AGT GGT CGA TAT	1345
Ser Ser Ser Leu His Leu Gly Gly Leu Thr Asn Gly Ser Gly Arg Tyr	
435 440 445	
ATC TCT GCA GCA CCT GGA GCA GAA GCA AAA TAT CGA AGT GCT TCA AGC	1393
Ile Ser Ala Ala Pro Gly Ala Glu Ala Lys Tyr Arg Ser Ala Ser Ser	
450 455 460	
ACT TCC AGT CTA TTT AGC TCC AGC AGC CAG CTC TTT CCT CCT TCC CGG	1441
Thr Ser Ser Leu Phe Ser Ser Ser Ser Gln Leu Phe Pro Pro Ser Arg	
465 470 475 480	
CTT CGG TAT AAT AGG TCT GAT ATT ATG CCT TCT GGC CGC AGT AGA TTA	1489
Leu Arg Tyr Asn Arg Ser Asp Ile Met Pro Ser Gly Arg Ser Arg Leu	
485 490 495	
TTG GAA GAT TTC AGA AAC AAC CGC TTC CCA AAC CTT CAG CTT AGA GAC	1537
Leu Glu Asp Phe Arg Asn Asn Arg Phe Pro Asn Leu Gln Leu Arg Asp	
500 505 510	
TTG ATT GGA CAT ATA GTT GAG TTT TCT CAA GAC CAG CAT GGT TCT AGA	1585
Leu Ile Gly His Ile Val Glu Phe Ser Gln Asp Gln His Gly Ser Arg	
515 520 525	
TTC ATA CAG CAA AAA CTA GAG AGA GCT ACT CCA GCT GAG CGA CAG ATG	1633
Phe Ile Gln Gln Lys Leu Glu Arg Ala Thr Pro Ala Glu Arg Gln Met	
530 535 540	
GTA TTT AAT GAA ATT CTG CAA GCA GCC TAT CAA TTA ATG ACT GAT GTT	1681
Val Phe Asn Glu Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Gln Leu Met Thr Asp Val	
545 550 555 560	

TTT GGC AAC TAT GTT ATA CAG AAG TTT TTT GAG TTT GGG AGT CTG GAT	1729
Phe Gly Asn Tyr Val Ile Gln Lys Phe Phe Glu Phe Gly Ser Leu Asp	
565 570 575	
CAA AAA TTA GCC CTG GCT ACT CGT ATT CGT GGT CAT GTT CTA CCC TTA	1777
Gln Lys Leu Ala Leu Ala Thr Arg Ile Arg Gly His Val Leu Pro Leu	
580 585 590	
GCC TTG CAG ATG TAT GGC TGC CGC GTT ATT CAG AAA GCA TTA GAA TCT	1825
Ala Leu Gln Met Tyr Gly Cys Arg Val Ile Gln Lys Ala Leu Glu Ser	
595 600 605	
ATT TCT TCT GAC CAG CAG AGT GAA ATG GTA AAG GAG CTG GAT GGT CAT	1873
Ile Ser Ser Asp Gln Gln Ser Glu Met Val Lys Glu Leu Asp Gly His	
610 615 620	
GTG CTC AAA TGT GTG AAA GAT CAG AAT GGA AAC CAT GTT GTA CAA AAA	1921
Val Leu Lys Cys Val Lys Asp Gln Asn Gly Asn His Val Val Gln Lys	
625 630 635 640	
TGT ATC GAA TGT GTT CAG CCA CAG TCA CTA CAG TTC ATC ATT GAT GCT	1969
Cys Ile Glu Cys Val Gln Pro Gln Ser Leu Gln Phe Ile Ile Asp Ala	
645 650 655	
TTC AAG GGA CAA GTA TTT GTG CTT TCA ACT CAT CCT TAT GGC TGC AGA	2017
Phe Lys Gly Gln Val Phe Val Leu Ser Thr His Pro Tyr Gly Cys Arg	
660 665 670	
GTA ATT CAG CGC ATC CTA GAG CAT TGC ACT GCA GAA CAG ACC TTA CCT	2065
Val Ile Gln Arg Ile Leu Glu His Cys Thr Ala Glu Gln Thr Leu Pro	
675 680 685	
ATC TTA GAA GAA CTC CAC CAA CAT ACA GAG CAG TTG GTA CAG GAT CAG	2113
Ile Leu Glu Glu Leu His Gln His Thr Glu Gln Leu Val Gln Asp Gln	
690 695 700	
TAT GGC AAT TAT GTT ATT CAG CAT GTA CTG GAA CAC GGT CGA CCT GAA	2161
Tyr Gly Asn Tyr Val Ile Gln His Val Leu Glu His Gly Arg Pro Glu	

705	710	715	720	
GAC AAG AGC AAA ATT GTT TCC GAA ATC AGG GGA AAG GTT TTA GCC CTG				2209
Asp Lys Ser Lys Ile Val Ser Glu Ile Arg Gly Lys Val Leu Ala Leu				
	725	730	735	
AGT CAA CAC AAA TTT GCC AGC AAT GTA GTA GAA AAG TGT GTT ACT CAT				2257
Ser Gln His Lys Phe Ala Ser Asn Val Val Glu Lys Cys Val Thr His				
	740	745	750	
GCC TCC CGT GCT GAG AGA GCT TTA CTG ATT GAC GAG GTT TGC TGC CAG				2305
Ala Ser Arg Ala Glu Arg Ala Leu Leu Ile Asp Glu Val Cys Cys Gln				
	755	760	765	
AAT GAT GGT CCT CAC AGT GCC TTA TAC ACC ATG ATG AAG GAC CAG TAT				2353
Asn Asp Gly Pro His Ser Ala Leu Tyr Thr Met Met Lys Asp Gln Tyr				
	770	775	780	
GCC AAT TAC GTG GTT CAA AAG ATG ATT GAT ATG GCT GAA CCT GCT CAG				2401
Ala Asn Tyr Val Val Gln Lys Met Ile Asp Met Ala Glu Pro Ala Gln				
	785	790	795	800
AGA AAG ATA ATC ATG CAC AAG ATT CGA CCT CAC ATT ACT ACT TTG CGC				2449
Arg Lys Ile Ile Met His Lys Ile Arg Pro His Ile Thr Thr Leu Arg				
	805	810	815	
AAA TAC ACA TAC GGG AAG CAT ATA CTG GCC AAG TTG GAA AAG TAT TAT				2497
Lys Tyr Thr Tyr Gly Lys His Ile Leu Ala Lys Leu Glu Lys Tyr Tyr				
	820	825	830	
TTG AAG AAT AGC CCG GAC CTA GGA CCT ATT GGA GGA CCA CCA AAT GGA				2545
Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Gly Pro Ile Gly Gly Pro Pro Asn Gly				
	835	840	845	
ATG CTG TAAATTACAG GAGCAAGAGA AAGAAGATAA TTAAACCATG TGAAAAGAAT				2601
Met Leu				
	850			
TTTTTTGTGC GTGAATTATC AAAACACAAC TCAACTATGA ATCTTCAATT TTTTTTTAAA				2661

GCAAACTAT TTATTGACTT TATTCATCCA TTTGTAAATT TTTTAAGGTT CTTGTGTATA 2771  
 TTTGGGGGGT GGGGGATGAA TTATAAATTA TATTCAGCCC TGAGTGGAGA CCTATCAGAT 2781  
 TGGATTGCTG GCAAAGCACA GAATGCCTGT ATATGATGTA ACTGTATCAA AAATAAAAAAG 2841  
 CTGTCACATA TTTTGTAAAT TTTTACCTTG TAAAGTCACA AAAATAGTTT TTAAAGGAAA 2901  
 AAGTACAGTA TTCTTTTAAT AAACCTGGCTC ACAGTCTGGT AGGTCTACAA CCCCATAGCA 2961  
 CAACAGGTTT ATAGAGATGT ATATAGAATT ATAGTCCTTA TTTTTTTCCT TTGCGTGAAA 3021  
 CCTTTTATAA CAGATTAACA ATCAACTGCA TAAATATTAT TAATATTTTA AAAAGAGTTA 3081  
 AGTTGTATTT TGATAATTCA CAAACTATCA TGCAAATAAC GAGTAAGTAG ACAAGAATAA 3141  
 AGTGGTTTGA GATGAAAAGA ACCTAACATT ATTTACAGTA GATGTGGTTT TAATACAATT 3201  
 ACTGCCCTAA AATGTCTCTG GCAATGTACA GAAATATTGT ATATACTTAC ATATGTAATT 3261  
 GTTGAAGAG TTAAATACAA AATCATGGTG ACACTTCCAA TTAAGTGCAC TAAATGAAAA 3321  
 GTTAAGTCAC TTATTAACCTT TTCAGTTTGG TTTGCAATGA GAAAGAGTGG AAATTTGTAT 3381  
 TTTGTTTTGC TTATAGAATT ACAGACATGT TGAGGAAGTG TTGAGCTTTA TTTTGCTTTT 3441  
 TCATAGAGGC AGAAAGTAGG AACCAGATAG AGATGAAAAG GGGCCACTGA AAAGTGAATT 3501  
 TGATAGCTCA GCATTTAAGC ATGATTACAT ATTCAGATAG CTCTTTTTGC TTTCTATAAA 3561  
 TATATGCATT GTGTGTGTAG TAATAGATGT AAGTTTACAC TTTGAAAGGA AATCTTGTTT 3621  
 CAATGTTTAT TATAAAAGCC TTGCTAATTT AGTAGTGATG CTTTCCTTGG TTGTACAGGT 3681  
 GTACATTTGT AAACCTTCAT GCTGTAAATG GAATTTGTTT TATCTCTTTG GGATACATTT 3741  
 GCATTTTAGT GTACATTTAC GTCCCTGCCC TCTTTGACCT GGCAATATAG TGTTGTATAA 3801  
 TGTAATTTA TTTCTCCAAA TCGAGAGTGA TTTTTTAAAA ATTTTTTATC TTTATATGGT 3861  
 TTCAGAAGTA TGAACCAGCT TTCTTTTTAT TATTGTGAGA TCATTTTGTT TTATAACATA 3921  
 GTTGTTGACT GTTAATATGG ACCTGCTAGA ATTTGGATCA CTTTCAATTG AAGTCAGGGT 3981  
 ATTGTGCATA ATAGAAAGTA TTGGACTGAG ATATTTGGTT ACCATGGAGG CCAATGCTTT 4041  
 TTTCATCTTA TTAAATGTGA TGTGACTTTT TTCTTTGTAC AGAAGAGTAC TGTATTTTTG 4101  
 AATAGCCTAC TCCCAAGTAA GAGCAAATCT GTATGATAAC ATTTTTTCCT CTGGACATAA 4161  
 GACATAACAG TAACACGATG TACATTTACA AGCGGCCTTA TGTACATTTT CCAACAATCT 4221  
 TTTTAAGGCA AAATTGTGAC CATATGTGTA TAATTAATAA CGTTTTTAAT CCTTTGCCTA 4281  
 TGAAAAATATT TTGGAAGAAA ACTTGCTGTG TATATTCAGT TTCTGAAAGA TAAAGAAAGT 4341  
 GCTTTGTATT TTGTTGAAGT CAGTATTTTG TATAAACATT TATGTTGACC CACTTATGTT 4401

CAGTGCTGAA AACTAAAATG AACATGCTAT TCTGTCAGCT GAATATGGAA GAGATCTTTT 4461  
 TTTACTAGAG ATCTGCAGAA GAAACGCAAT CTTCTGAGCA CAATATGGAA TCTAAAGGTT 4521  
 TTATCACTTA GTTGTTCATA TTATGAACCT AAAAATAATG GCATAAAGTT TGGGGATGCC 4581  
 AGGCATACTT TTTCATGTTT GGTGTTGAGT TATTTTACTT TTCTAACCCA ACATTCTTG 4641  
 GTGAGACCAT TAAATCCAAA CACTTGTCAC CGTTCCTTCT CATAGTCACT CTGGGTCATC 4701  
 AGCATGTCCC AGTCACTGCA GCAACGCCTT GTGTTTGTTC CATTTTTTTA AAACCCACAC 4761  
 AAAGCCGCTG TCTCACTTTT TCCTACTTTA CCAACCTCAG AGTATTCGG CCCGTATCGA 4821  
 ACTTTTGTTC TCAGTATCAG CCCATGGTTT CAGGATCAAA GCTGTCATGT TGGAGATTGG 4881  
 TAATGGCTTT CCTGTCTTTG TACAGTTGAA TTCCTAGTCT TCCTTCATCC TTGCCCTCTG 4941  
 TTGGCACAGG CATTATCTCT GCAATTTTAG AAAATGACAA GTAGAGAATA CTACATTGAG 5001  
 AAACTAAACC CTCTTCTTGG GGTCCGTGATA CTCATTCCCA TTTGTCCCAG TGCTGACAAC 5061  
 CCAATCTTCC CAATACTTTC AGGCCTGCTC TACAAAAGTA CCTGTTCTTG TAGAAATTTT 5121  
 ACAGTCTGCC ATTTTGGGTG CCCACCCCAA TTTTACCTT TTAGTAAGTT GGCATGAAAT 5181  
 TTTGGTAAAA TCTGAAAATC ACATTCAGA ATAAAACAAT TGGGCAAAAC TACCTAGGCT 5241  
 TTA CTCTTGA GTGCTCCTT TTGATAGGGA TTGTTTCTGG ACCAGTTTGT CTAAGTCCTG 5301  
 GCTCTTATTG GTTCATATGA AATAATGTGA ACTTCACTTC TTTGTATATT ATGTATAAAT 5361  
 TAGAAAATGA AAAATGTGTG AATAACATTG TATGAAAT 5399

【0066】

配列番号：2

配列の長さ：850

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

起源

生物名：ヒト

セルライン：KG-1

Glu Phe Ser Asn Pro Glu Thr Gln Asn Leu Asp Ala Met Glu Gln Val

1

5

10

15

Gly Leu Glu Ser Leu Gln Phe Asp Tyr Pro Gly Asn Gln Val Pro Met

20	25	30
Asp Ser Ser Gly Ala Thr Val Gly Leu Phe Asp Tyr Asn Ser Gln Gln		
35	40	45
Gln Leu Phe Gln Arg Thr Asn Ala Leu Thr Val Gln Gln Leu Thr Ala		
50	55	60
Ala Gln Gln Gln Gln Tyr Ala Leu Ala Ala Ala Gln Gln Pro His Ile		
65	70	75
Ala Gly Val Phe Ser Ala Gly Leu Ala Pro Ala Ala Phe Val Pro Asn		
85	90	95
Pro Tyr Ile Ile Ser Ala Ala Pro Pro Gly Thr Asp Pro Tyr Thr Ala		
100	105	110
Ala Gly Leu Ala Ala Ala Ala Thr Leu Ala Gly Pro Ala Val Val Pro		
115	120	125
Pro Gln Tyr Tyr Gly Val Pro Trp Gly Val Tyr Pro Ala Asn Leu Phe		
130	135	140
Gln Gln Gln Ala Ala Ala Ala Ala Asn Asn Thr Ala Ser Gln Gln Ala		
145	150	155
Ala Ser Gln Ala Gln Pro Gly Gln Gln Gln Val Leu Arg Ala Gly Ala		
165	170	175
Gly Gln Arg Pro Leu Thr Pro Asn Gln Gly Gln Gln Gly Gln Gln Ala		
180	185	190
Glu Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asn Pro Thr Leu Ala Phe Gly		
195	200	205
Gln Gly Leu Ala Thr Gly Met Pro Gly Tyr Gln Val Leu Ala Pro Thr		
210	215	220
Ala Tyr Tyr Asp Gln Thr Gly Ala Leu Val Val Gly Pro Gly Ala Arg		
225	230	235
Thr Gly Leu Gly Ala Pro Val Arg Leu Met Ala Pro Thr Pro Val Leu		
245	250	255



Ile Ser Ser Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly  
 260 265 270

Thr Ala Ser Ser Leu Thr Gly Ser Thr Asn Gly Leu Phe Arg Pro Ile  
 275 280 285

Gly Thr Gln Pro Pro Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Ser Thr Asn Leu  
 290 295 300

Gln Ser Asn Ser Phe Tyr Gly Ser Ser Ser Leu Thr Asn Ser Ser Gln  
 305 310 315 320

Ser Ser Ser Leu Phe Ser His Gly Pro Gly Gln Pro Gly Ser Thr Ser  
 325 330 335

Leu Gly Phe Gly Ser Gly Asn Ser Leu Gly Ala Ala Ile Gly Ser Ala  
 340 345 350

Leu Ser Gly Phe Gly Ser Ser Val Gly Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ala  
 355 360 365

Thr Arg Arg Glu Ser Leu Ser Thr Ser Ser Asp Leu Tyr Lys Arg Ser  
 370 375 380

Ser Ser Ser Leu Ala Pro Ile Gly Gln Pro Phe Tyr Asn Ser Leu Gly  
 385 390 395 400

Phe Ser Ser Ser Pro Ser Pro Ile Gly Met Pro Leu Pro Ser Gln Thr  
 405 410 415

Pro Gly His Ser Leu Thr Pro Pro Pro Ser Leu Ser Ser His Gly Ser  
 420 425 430

Ser Ser Ser Leu His Leu Gly Gly Leu Thr Asn Gly Ser Gly Arg Tyr  
 435 440 445

Ile Ser Ala Ala Pro Gly Ala Glu Ala Lys Tyr Arg Ser Ala Ser Ser  
 450 455 460

Thr Ser Ser Leu Phe Ser Ser Ser Ser Gln Leu Phe Pro Pro Ser Arg  
 465 470 475 480

Leu Arg Tyr Asn Arg Ser Asp Ile Met Pro Ser Gly Arg Ser Arg Leu

485	490	495
Leu Glu Asp Phe Arg Asn Asn Arg Phe Pro Asn Leu Gln Leu Arg Asp		
500	505	510
Leu Ile Gly His Ile Val Glu Phe Ser Gln Asp Gln His Gly Ser Arg		
515	520	525
Phe Ile Gln Gln Lys Leu Glu Arg Ala Thr Pro Ala Glu Arg Gln Met		
530	535	540
Val Phe Asn Glu Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Gln Leu Met Thr Asp Val		
545	550	555
Phe Gly Asn Tyr Val Ile Gln Lys Phe Phe Glu Phe Gly Ser Leu Asp		
565	570	575
Gln Lys Leu Ala Leu Ala Thr Arg Ile Arg Gly His Val Leu Pro Leu		
580	585	590
Ala Leu Gln Met Tyr Gly Cys Arg Val Ile Gln Lys Ala Leu Glu Ser		
595	600	605
Ile Ser Ser Asp Gln Gln Ser Glu Met Val Lys Glu Leu Asp Gly His		
610	615	620
Val Leu Lys Cys Val Lys Asp Gln Asn Gly Asn His Val Val Gln Lys		
625	630	635
		640

Cys Ile Glu Cys Val Gln Pro Gln Ser Leu Gln Phe Ile Ile Asp Ala  
645 650 655

Phe Lys Gly Gln Val Phe Val Leu Ser Thr His Pro Tyr Gly Cys Arg  
660 665 670

Val Ile Gln Arg Ile Leu Glu His Cys Thr Ala Glu Gln Thr Leu Pro  
675 680 685

Ile Leu Glu Glu Leu His Gln His Thr Glu Gln Leu Val Gln Asp Gln  
690 695 700

Tyr Gly Asn Tyr Val Ile Gln His Val Leu Glu His Gly Arg Pro Glu  
705 710 715 720

Asp Lys Ser Lys Ile Val Ser Glu Ile Arg Gly Lys Val Leu Ala Leu  
725 730 735

Ser Gln His Lys Phe Ala Ser Asn Val Val Glu Lys Cys Val Thr His  
740 745 750

Ala Ser Arg Ala Glu Arg Ala Leu Leu Ile Asp Glu Val Cys Cys Gln  
755 760 765

Asn Asp Gly Pro His Ser Ala Leu Tyr Thr Met Met Lys Asp Gln Tyr  
770 775 780

Ala Asn Tyr Val Val Gln Lys Met Ile Asp Met Ala Glu Pro Ala Gln  
785 790 795 800

Arg Lys Ile Ile Met His Lys Ile Arg Pro His Ile Thr Thr Leu Arg  
805 810 815

Lys Tyr Thr Tyr Gly Lys His Ile Leu Ala Lys Leu Glu Lys Tyr Tyr  
820 825 830

Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Gly Pro Ile Gly Gly Pro Pro Asn Gly  
835 840 845

Met Leu  
850

[0067]

配列番号 : 3

配列の長さ : 50

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

CTCTAGAGGC GGCCGCTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT 50

【0068】

配列番号 : 4

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

GTTTTTTTTT TTTTTC 17

【0069】

配列番号 : 5

配列の長さ : 10

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

AGGGCGTAAG 10

【0070】

配列番号 : 6

配列の長さ : 22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

GCATGCCTAT TGGACTTGGG GA

22

【0071】

配列番号：7

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

GTTGGCAGTT CTGCAAGTAG TAGT

24

【0072】

配列番号：8

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CCCATCACCA TCTTCCAGGA GC

22

【0073】

配列番号：9

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TTCACCACCT TCTTGATGTC ATCATA

26

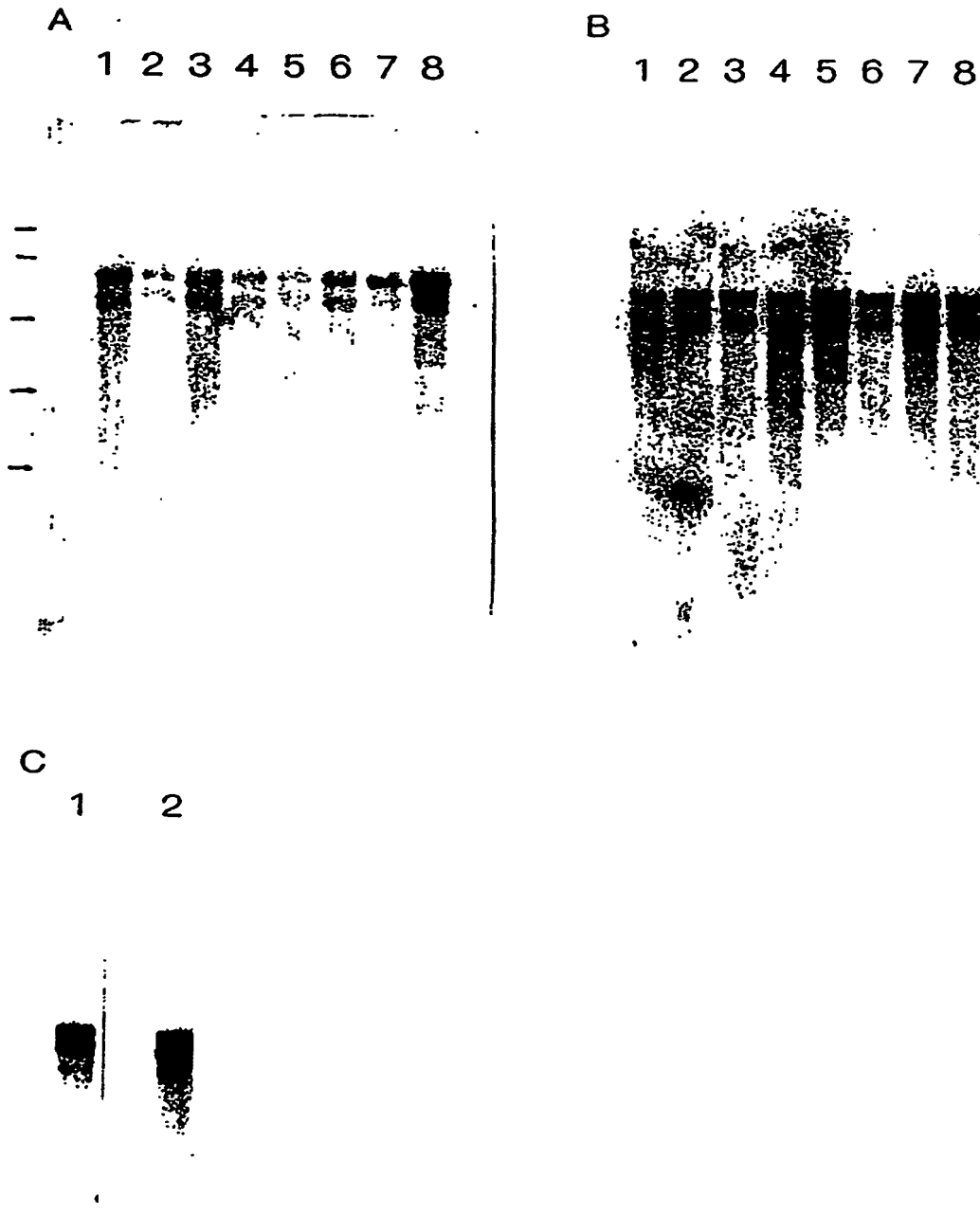
# 【図面の簡単な説明】

【図1】は、実施例5のヒト組織および細胞でのKIAA0235のノーザンブロットのオートラジオグラフである。A、Bはヒトの組織でのもので、Aの1は脾臓、2は腎臓、3は骨格筋、4は肝臓、5は肺、6は胎盤、7は脳、8は心臓の各RNA、Bの1は末梢白血球、2は大腸、3は小腸、4は卵巣、5は精巣、6は前立腺、7は胸腺、8は脾臓の各RNAをブロットしたフィルターのオートラジオグラフである。Cはヒト細胞株でのもので、1はHeLa、2はKG-1の各細胞株のRNAをブロットしたフィルターのオートラジオグラフである。Aの左端の線はRNAのマーカーの位置であり、上から9.5kb、7.5kb、4.4kb、2.4kb、1.35kbを示す。

【図2】は、実施例4のIgA腎症患者と健常人の白血球に対するKIAA0235のRT-PCRのフルオロイメジャーでの検出結果である。1-5は健常人5例の白血球、6-10はIgA腎症患者5例の白血球についてのRT-PCR、Cはポジティブコントロールとして、デフェレンシャル・ディスプレイで得られたKIAA0235 cDNAの増幅断片が組み込まれたプラスミドをテンプレートにして行ったPCR反応を示す。

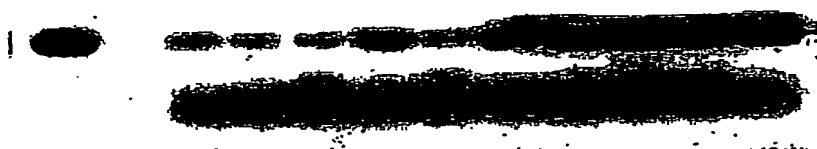
【書類名】 図面

【図1】



【図2】

C      1   2   3   4   5   6   7   8   9   10





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 IgA腎症の疾患原因の解明、治療あるいは患者の負担を軽減した診断を行うため、IgA腎症に関与する新規蛋白質、該遺伝子、IgA腎症の診断薬および治療薬を提供することにある。

【解決手段】 IgA腎症患者白血球より単離された新規蛋白質、該蛋白質をコードするDNA配列に関する。また、該DNAと相補的な塩基配列に基づくオリゴヌクレオチド、該蛋白質に特異的に反応する抗体、さらにそれらを含むIgA腎症診断薬および治療薬に関する。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000001029  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町1丁目6番1号  
【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 596175810  
【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那1532-3  
【氏名又は名称】 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

【代理人】

申請人  
【識別番号】 100106574  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町1丁目6番1号 協和醗酵工業株式会社 知的財産部  
【氏名又は名称】 岩橋 和幸

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日	1990年 8月 6日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名	協和醗酵工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596175810]

1. 変更年月日 1996年12月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県木更津市矢那1532-3

氏 名 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所